А.В. Бокарев, А.А. Стекольников

К МЕТОДИКЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ СОБАК

Введение

Щелочная фосфатаза (ALP - Alkaline phosphatase) - фосфогидролаза моноэфиров ортофосфорной кислоты (К.Ф. 3.1.3.1,) - фермент, относящийся к семейству фосфатаз, класса гидролаз. ALP действует на различные моноэфиры ортофосфорной кислоты, как алифатические, так и ароматические, вследствие чего вызывает их расщепление на ортофосфорную кислоту и различные спирты и фенолы. Фермент выполняет свою физиологическую активность в щелочной среде с оптимумом pH 9.2-9.8 [1, 10, 17, 22]. Современная клиническая биохимия различает, по крайней мере, 5 тканеспецифичных изоферментов щелочной фосфатазы: печеночный (LALP - Liver Alkaline phosphatase), костный (BALP - Bone Alkaline phosphatase), кишечный (IALP - Intestinal Alkaline phosphatase), плацентарный (PALP - Placenta Alkaline phosphatase) и почечный (RALP - Renal Alkaline phosphatase) [10, 11, 22, 24, 25, 27]. У собак встречается шестой кортикостероид-индуцированный изофермент (CALP - Corticosteroid-induced Alkaline phosphatase), который не присутствует в крови здоровых собак, но появляется у животных, больных гиперадренокортицизмом или принимающих глюкокортикостероиды [11, 22, 26, 28]. Данные лабораторного анализа активности общей сывороточной щелочной фосфатазы (TALP) носят неконкретный характер, так как активность фермента может повышаться как при очень многих заболеваниях, так и при некоторых физиологических состояниях, а так же при приеме некоторых лекарств [1, 3,11,13,19, 21, 22, 23]. Напротив, информация о том, какой из изоферментов ALP ответственен за подъем TALP, может давать точное указание на то, какой орган вовлечен в патологический процесс [4,11,16,18,20,22,24]. Определить изоферментный профиль ALP сыворотки крови можно разными методами, в том числе иммуноферментным, или электрофоретически с последующей денситометрией [1,11,13,22]. Однако в условии небольших клиник и (или) для экспресс диагностики удобнее пользоваться полуколичественным методом, основанным на использовании селективных физических, химических или фармакологических ингибиторов [10,11,13,17,22]. Принцип метода заключается в том, что различные физические, химические или фармакологические факторы не одинаково подавляют активность различных изоферментов ALP Исходя из этого, вклад конкретного изофермента в общую сывороточную активность ALP можно оценить на основании изменения кинетических характеристик ферментативной реакции до и после применения селективного ингибитора.

Однако следует заметить, что прикладное использование данных по биологии ALP, непосредственно в клинической биохимии обусловлено объективным различием методических подходов, которое выражается в том, что, фундаментальная биохимия работает с очищенными ферментами и (или) их изоформами [1, 17, 28]. В то время как клиническая биохимия чаще работает с нативными биологическими материалами (сыворотка, плазма, ликвор, моча, выпоты и т.д.) в которых энзимы соседствуют с огромным количеством балластных веществ, некоторые из них могут оказывать влияние на каталитические свойства фермента [19, 20,21]. Кроме того, ферменты в данных биологических жидкостях, присутствуют в виде суммы изоферментов, суммарная каталитическая активность которых может затруднять визуализацию специфических каталитических свойств конкретного изозима [3, 4, 11, 16, 19,24]. С клинической точки зрения крайне важно, что некоторые изоферменты ALP, имеют не количественное, а качественное диагностическое значение,т.е.,появляются только при наличии конкретной патологии [4,11,22,25,28]. Но их активность не обязательно должна быть столь велика, что бы доминировать над суммарной активностью имманентно присутствующих физиологических изоформ ALP.

Исходя из этого, следует предположить, что степень и вид ингибирования активности ALP цельной сыворотки крови, будет зависеть не только от доминирующего изофермента, но и от присутствия и соотношения сопутствующих физиологических и патологических изоформ энзима,

от их индивидуальной чувствительности к ингибитору, а так же от эндогенных активаторов и ингибиторов.

Поэтому механический перенос условий и результатов эксперимента фундаментальной биохимии в клиническую не совсем корректен и требует перепроверки. И именно этим, видимо, можно объяснить то, что, во первых, результаты исследований в области ALP-изоферментной диагностики болезней собак, проведенной с помощью селективных ингибиторов, носят скорее научный, чем клинический характер. Во вторых, такие данные значительно варьируют, а иногда и противоречат друг другу [19,21]. И, в третьих, методика определения изоферментного статуса сывороточной ALP, основанная на применении селективных ингибиторов не находит широкого применения в лабораториях и отсутствует в методических пособиях по клинической биохимии. Негативным следствием выше описанной ситуации является то, что достаточно часто, авторы клинических и научных исследований, вопреки реальной возможности использовать для постановки объективного диагноза метод изоферментного тестирования ALP, тем не менее, в основу диагностического заключения ставят столь косвенные биохимические показатели, которые при желании могут быть истолкованы совершенно иначе [6,7].

Одним из селективных ингибиторов ALP является препарат левамизол (L-2,3,5,6-тетрагидро-6-фенилимидазо-{2,1-Ь}-тиазол). Считается что левамизол в дозе 10-5 М интибирует ферментативную активность костного (BALP), печеночного (LALP) и почечного изоферментов (причем LALP более чувствителен, чем BALP и RALP) и не ингибирует активность кишечного (IALP) и кортикостероид-индуцированного (CALP) [2,5,9,11,12,14,17.26, 27,28]. Теоретически подобная избирательная йнгибирующая активность левамизола должна, например, позволить легко дифференцировать алиментарный рахит от стероидной остеодистрофии или гепатит от энтерита, так как в одном случае высокая активность TALP обусловлена подъемом активностей BALP или LALP, которая подавляется левамизолом, а в другом случае за счет активности CALP или IALP, которые к левамизолу нечувствительны. Однако, как уже было сказано выше, данные, полученные на препаратах очищенных ферментов, невозможно механически перенести в клиническую биохимию. А результаты исследований по клинической биохимии животных либо часто не совпадают с ожидаемыми, либо их невозможно сравнивать из за методических различий в проведении анализов.

Таким образом, очевидно, что для получения клинически достоверной информации по активности доминирующего или вновь появившегося изофермента, и последующей интерпретации и трансформации полученных данных в конкретный клинический диагноз, методику определения изоферментной активности ALP в сыворотке крови собак с помощью селективного ингибирования левамизолом необходимо унифицировать. Кроме того, необходимо определить границы ее диагностической возможности и точности.

Цель исследования

1. Изучить условия, механизм и кинетику ингибирования левамизолом общей активности ALP различных сывороток крови, взятых от собак, имеющих в анамнезе точно установленые заболевания, при которых сывороточная активность ALP превышает физиологический референт за счет активности BALP, LALP или CALP изофермента.

2. Сопоставить полученные данные по влиянию исследуемого ингибитора (левамизола) на ферментативную активность ALP нефракционированной сыворотки крови с конкретными заболеваниями.

3. Соотнести полученные данные с уже известными данными по изоферментной активности ALP в образцах сыворотки крови аналогичных исследуемым.

4. Определить, может ли тип ингибирования ALP левамизолом служить объективным диагностическим маркером доминирования в крови животного определенного изофермента ALP при конкретном заболевании.

5. Изучить биохимические и методические особенности ингибирования активности ALP левамизолом.

6. Определить оптимальные дозы ингибитора для использования с целью экспресс диагностики доминирующего изофермента ALP в сыворотке крови собак.

7. Дать методические рекомендации по использованию левамизола в биохимическом определении активности изоферментов ALP у собак.

Материалы и методы исследования

1. Объект исследования — сыворотки или плазмы крови, взятые от собак, имеющих в анамнезе костную патологию (ра-

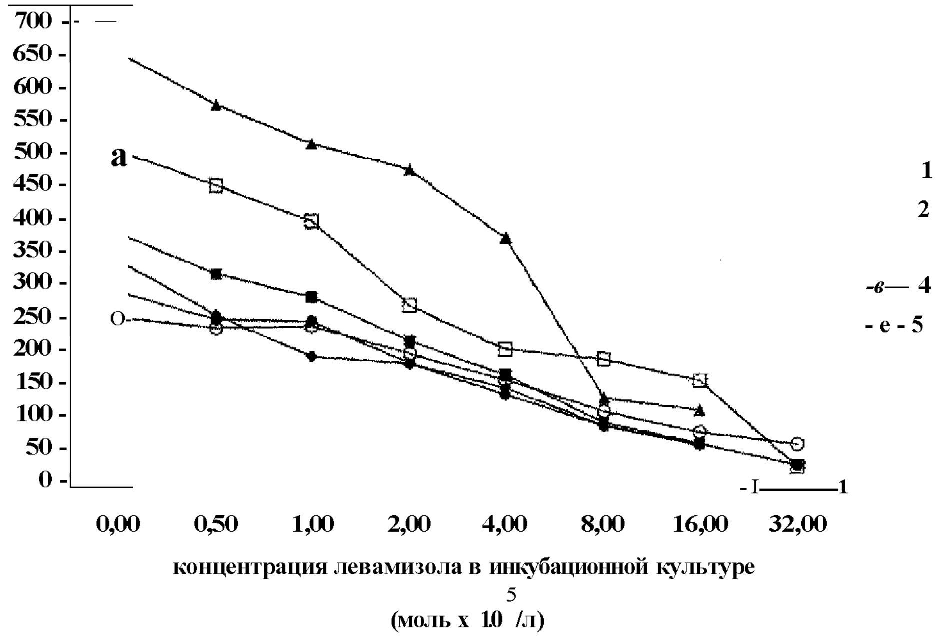

Рис. 1. Динамика подавления активности сывороточной ALP левамизолом в зависимости от исходной активности фермента. Представлены сыворотки шести (1 - б) щенков, больных рахитом.

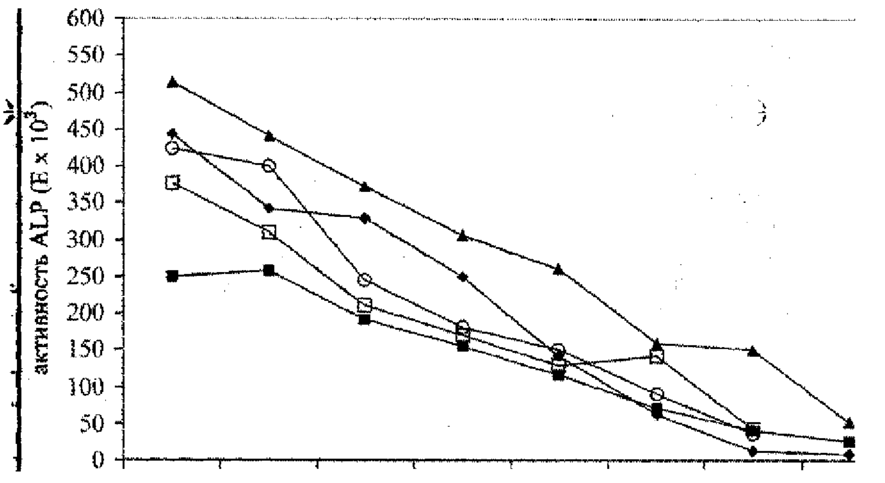

Рис. 2. Динамика подавления активности сывороточной ALP левамизолом в зависимости от исходной активности фермента. Представлены сыворотки шести (1-б) взрослых собак, больных острым "Гепатитом.

хит), патологию печени (гепатит), нарушение обмена глюкокортикостероидов (спонтанный или ятрогенный гиперадренокортицизм).

2. Активности щелочной фосфатазы в биологических жидкостях определяли «по конечной точке» методом Бессея-Лоури-Брока. Оптическую плотность растворов измеряли на микрофотоколориметре МКМФ-02 при светофильтре 420 nm., и на микрофотоколориметре МКМФ-02М при светофильтре 405 nm.

3. В качестве селективного ингибитора активности щелочной фосфатазы использовали левамизол фирмы «SIGMA». Сухой препарат разводили стерильным фи-

зиологическим раствором и доводили до необходимой концентраций рабочим буфером. Ингибитор вносили в инкубационную смесь в обьеме 0,005 мл., что составляло всего 0,4% от общего объема (1,25 мл) инкубационной смеси.

4. Полученную величину оптической плотности «Е», для удобства, не переводили в единицы активности мкмоль/мл/час или Ед/л. а выражали через Ex10³.

5. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы «Hrimer Biostatistics» версия 4,03.

6. Построение графиков проводили с использованием программы «Microsoft Graph» (1997 год).

Результаты исследования

Исследовали влияние дозы левамизола на степень подавления каталитического действия ALP, в зависимости от исходной активности фермента. Результаты экспериментов, проведенных отдельно на сыворотках собак с доминирующей активностью BALP, LALP и CALP изоферментов ALP представлены на рисунках №1, №2 и №3, соответственно. Материал представленный на рисунках №1 и №2 наглядно демонстрирует, что в сыворотках крови имеющих доминантную активность BALP и LALP изоферментов, конечная активность фермента зависит как от его исходной активности так и от концентрации ингибитора. Подобная зависимость наблюдается, практически во всех исследованных источниках (сыворотках) фермента. Сыворотки, демонстрирующие высокую активность CALP изофермента (рис. 3), напротив, показывают полное отсутствие или крайне низкую чувствительность к ингибирующему влиянию левамизола. Может ли на остаточную чувствительность к левамизолу, у ALP сывороток собак со спонтанным или индуцированным гиперадренокортицизмом, влиять присутствие изофермента отличного от CALP, продемонстрировано в эксперименте со смешанными сыворотками (рис. 4).

Результаты этого эксперимента наглядно демонстрируют, что количественное соотношение левамизолчувствительного (BALP) и левамизолнечувствительного (CALP) изоферментов в сыворотке крови влияет на величину дозозависимого ингибирования общей сывороточной активности ALP.

Как показывают следующие эксперименты, на величину дозозависимого ингибирования общей сывороточной активности ALP не влияет концентрация субстрата (п-нитрофенилфосфата) (рис. 5). Это правило распространяется как на BALP, так и на LALP изоферменты сывороточной ALP. Однако очередность смешивания таких компонентов биохимической реакции как сыворотка, ингибитор и раствор субстрата в рабочем буфере, отражается на степени подавления активности фермента ингибитором, не зависимо от того, что конечная концентрация всех компонентов реакции остается прежней. Внесение сыворотки крови в смесь субстрата с ингибитором дает более высокую активность ALP, чем добавление субстрата к смеси сыворотки с ингибитором (рис. 6).

Обсуждение результатов

Из материалов исследования видно, что способность левамизола ингибировать активность сывороточной ALP при костной и печеночной патологии зависит от концентрации ингибитора в инкубационной среде, с одной стороны, и от исходной активности фермента, с другой (рис. 1, рис. 2). А учитывая, что, исходная активность ALP у разных собак может значительно варьировать, несмотря на сходный диагноз и одинаковую степень развития патологического процесса, очевидно, что абсолютная величина активности сывороточной ALP, измеренная в присутствии ингибитора, не может являться диагностически значимой.

Однако математическая обработка материалов исследования выявляет и другую закономерность, т.е. процент остаточной активности сывороточной ALP, так же как и абсолютная величина, линейно зависим от концентрации левамизола в инкубационной культуре, но относительно независим от исходной активности фермента (рис. 7, табл. 1).

Подобная закономерность четко выражена в отношении сывороток собак с костной и печеночной патологией, т.е. с доминирующей активностью BALP и LALP изоферментов ALP, соответственно. Однако, она отсутствует в отношении сывороток, взятых от собак со спонтанным или индуцированным гиперадренокортицизмом, так как доминирующий в них CALP изофермент нечувствителен, или слабо чувствителен, к ингибирующему действию левамизола. Различие в графической зависимости процента остаточной активности, от концентрации ингибитора, BALP и LALP изоферментов с одной стороны и CALP изофермента, с другой, столь существенно (при концентрации левамизола

Таблица 1

Процент (%) остаточной активности ALP нефракционированной плазмы крови собак в зависимости от концентрации левамизола и доминирующего изофермента

Доминирующий изофермент ALP	Концентрация левамизола в инкубационной культуре (моль/литр)							
	0	0.5x10-5	1x10-5	2x10-5	4x10-5	8x10-5	16x10-5	33x10-5
BALP (M±m)	100	89.4±2.40	77.60±6.36	60.34+4.58	46.41±3.38	27.99±3.24	19.56±2.77	11.05±3.80
LALP (M±m)	100	85,47±4,80	76,97÷2,76	65.88±3,2	41,95±3,71	26,95±4.20	12.20±3.21	9,50±1,67
CALP (M±m)	100	93,83±6,17	86,97±5,47	85,32±5,60	86,45±7,54	84,70±6.58	83,72±7.03	84,30±7.86

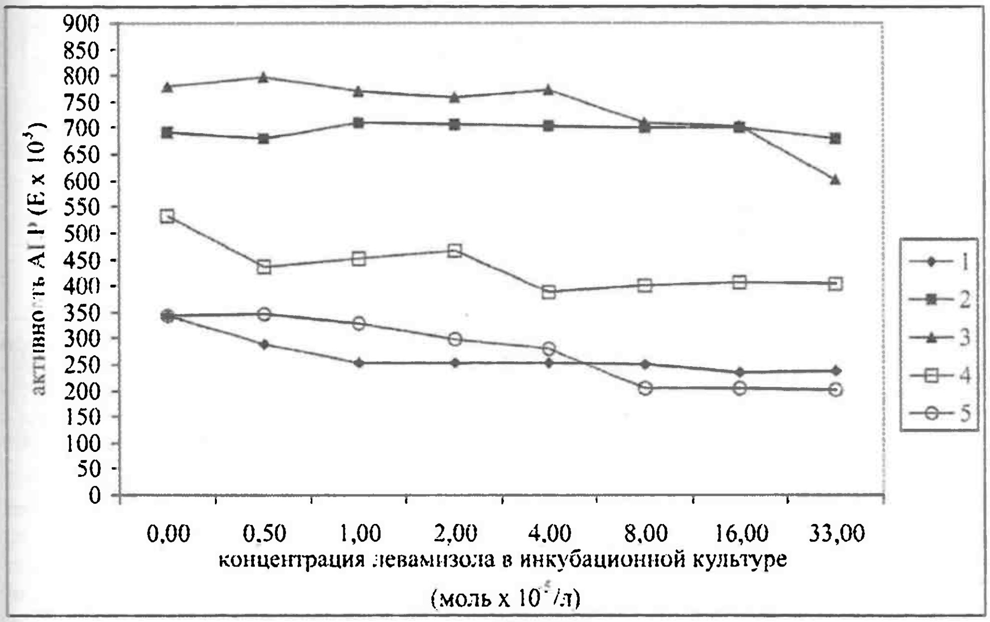

Рис. 3. Динамика подавления активности сывороточной ALP левамизолом в зависимости от исходной активности фермента. Представлены сыворотки пяти взрослых собак с гиперадренокортицизмом. №1, №2 и №5 сыворотки от собак со спонтанным гиперадренокортицизмом. №3 и №4 сыворотки от собак с ятрогенным гиперадренокортицизмом индуцированным приемом глюкокортикойдов. Сыворотка №2 разбавлена в 5 раз.

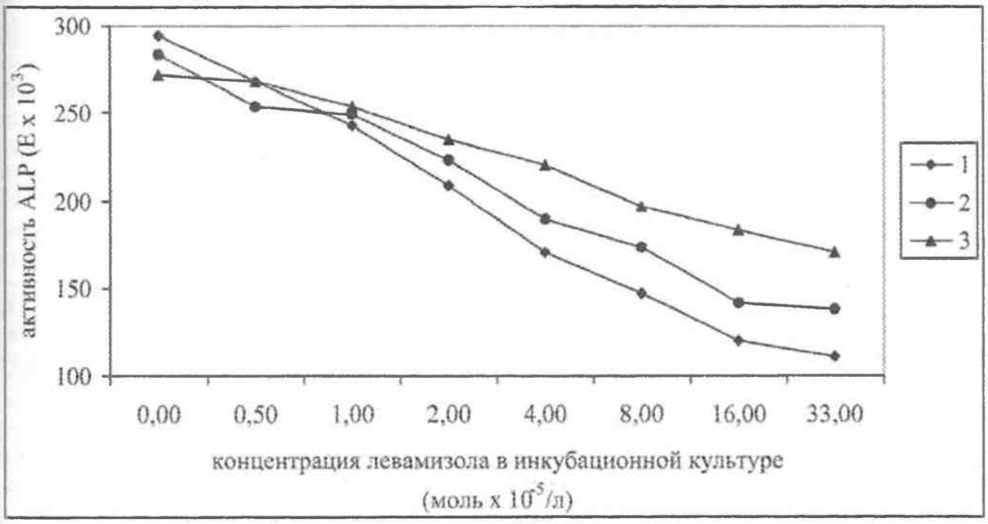

Рис.4. Динамика подавления активности сывороточной ALP левамизолом в зависимости от соотношения BALP и CALP активностей. Активность сывороток с доминирующими BALP и CALP изоферментами, методом разведения, доведены до Ex10³=280. Исходные BALP и CALP активности смешаны в соотношении №1 – 2/1, №2 – 1/1, №3 – 1/2.

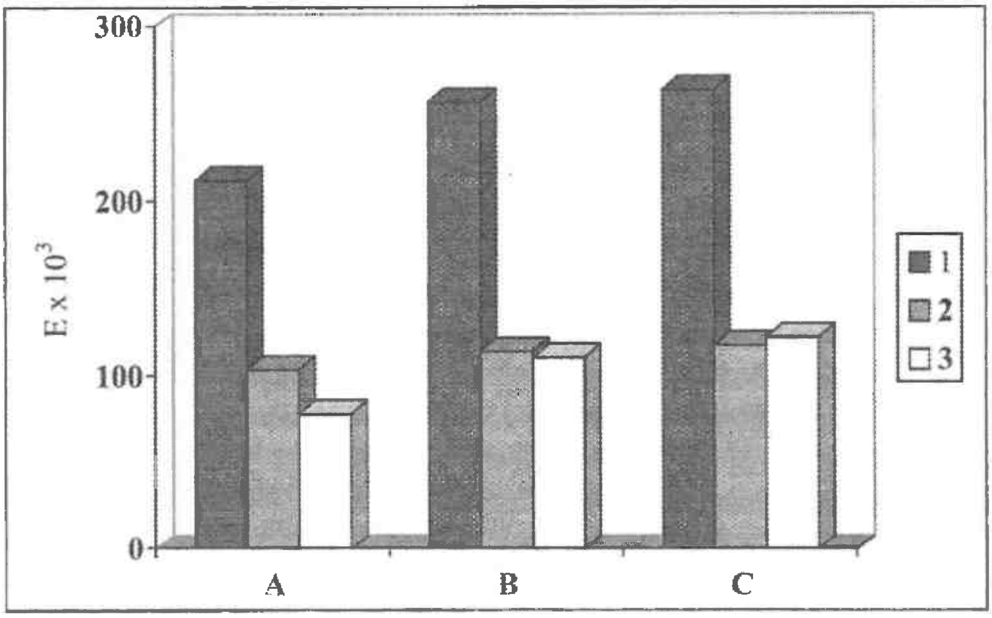

Рис. 5. Влияние концентрации субстрата ALP на ингибирующие свойства левамизола. А, В и С - сыворотки с доминирующими BALP, LALP и BALP + LALP в соотношении 1/1 активностями, соответственно. 1 - исходная ALP активность сыворотки без ингибитора с обычной концентрацией субстрата. *2* - активность ALP сыворотки в присутствии ингибитора (концентрация $4x10^{-5}$ моль/л.) с обычной концентрацией субстрата. 3 - активность ALP сыворотки в присутствии ингибитора (концентрация $4x10^{-5}$ моль/л.) с двойной концентрацией субстрата.

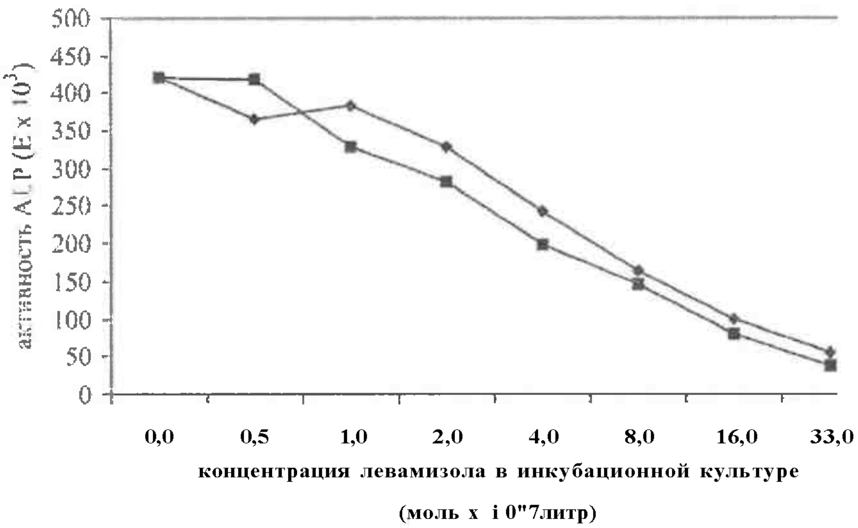

Рис. 6. Влияние очередности внесения ингибитора на последующую активность сывороточной ALP. Диаграмма №1отражает активность ALP при добавлении плазмы крови к смеси ингибитора с субстратом. Диаграмма №2 отражает активность ALP при добавлении раствора субстрата к предварительно смешанным плазме крови с ингибитором.

$4x10^{-5}$ моль/л. P=0,001 и далее стремится к нулю), что этот способ анализа данных может быть использован для определения наличия (или отсутствия) CALP изофермента в нефракционированных сыворотках собак. Однако следует обратить внимание на то, что дозозависимая динамика подавления ALP активности в индивидуальных сыворотках, взятых от собак со спонтанным или индуцированным гиперадренокортицизмом, может отличаться. Графики, представленные на рисунке №3, демонстрируют, по крайней мере три варианта чувствительности ALP к левамизолу в сыворотках

Рис. 7. Процент остаточной активности ALP сывороток крови собак, с доминирующей активностью BALP, LALP или CALP изофермента, в зависимости от концентрации ингибитора. Диаграмма построена на основании средних величин нескольких измерений. BALP n=6, LALP n=6, CALP н=8. (Смотреть таблицу **№1.)**

полученных от собак с гиперадренокортицизмом. Один вариант (сыворотки №3 и .V°4), это, хоть и слабое, но линейное уменьшение активности фермента при повышении дозы ингибитора. Второй вариант (сыворотки **№1** и №5), расщепление активностей фермента на ингибируемую левамизолом и нечувствительную к левамизолу, чья активность, после элиминации первой остается неизменной вне зависимости от дозы ингибитора. И третий вариант (сыворотка **№2),** полное отсутствие чувствительности ALP к ингибирующему действию как малых, так и больших доз левамизола. Гипотетически, отличие первых двух вариантов чувствительности от третьего, можно объяснить с позиции того, что в некоторых сыворотках крови могут одновременно присутствовать как левамизолчувствительные - BALP или LALP изоферменты так и левамизолустойчивый - CALP изофермент, количественное соотношение которых и определяет графический вариант дозозависимого ингибирования, что подтверждается экспериментально в опытах со смешанными сыворотками (рис. 4). Однако, может быть и другое объяснение, которое сводится к тому, что CALP изофермент не является продуктом особого гена, а является следствием посттрансляционной биохимической модификации предсуществующих левамизолчувствительных изоформ ALP, вследствие которой устойчивость фермента к ингибирующему действию левамизола повышается постепенно в конечном итоге переходя в полную нечувствительность. Практическая сторона этой проблемы состоит в том, что в конкретной исследуемой сыворотке крови доля активности левамизолустойчивого CALP изофермента может оказаться столь низкой, что чувствительность метода при использовании только одной дозы ингибитора может оказаться недостаточной. Поэтому методику следует повторять в присутствии такой дозы ингибитора, при которой активность BALP и LALP изоферментов становиться почти не определяемой. К примеру, искусственная сыворотка, в которой только одна третья часть активности ALP приходиться на CALP изофермент (Рис. 4. Сыворотка №1) демонстрирует 58% остаточной активности при дозе левамизола 4x10'' моль/л., что мало отличается от того, что демонстрируют усредненные данные по сывороткам с BALP и LALP активностями, 46.41+3.38% и 41,95+3,71% соответственно (таблица 1). Однако при дозе ингибитора 33x10' моль/л., это отличие становиться существенным 38% в случае исследуемой сыворотки, по сравнению с 11,05±3.80% и 9,50±1,67% контрольных измерений.

Положительным методическим мо-

ментом следует считать, то, что левамизол не является конкурентным ингибитором ALP, и увеличение концентрации субстрата в инкубационной среде не увеличивает остаточную активность фермента (рис. 5). Это дает основание предполагать, что основные диагностически значимые закономерности, описанные в данной работе, будут соблюдаться вне зависимости от избранной исследователями методики определения активности сывороточной ALP. С другой стороны, из материалов исследования следует, что если при постановке эксперимента сыворотка, исследуемая на активность ALP, в начале, смешивается с ингибитором, и уже затем добавляется субстратная смесь, то остаточная активность фермента оказывается на 14-30 процентов ниже, чем в случае добавления сыворотки в готовую смесь субстрата с ингибитором, (рис. 6). Такое уменьшение активности фермента, связанное с изменением порядка смешивания ингредиентов инкубационной смеси, обусловлено тем, что в случае первоначального смешивания сыворотки крови с ингибитором, молекулы ALP контактируют с концентрацией левамизола более чем в 9 раз более высокой, чем в случае добавления сыворотки в уже готовую смесь субстрата с ингибитором. Вероятно, высокие концентрации левамизола способны вызвать незначительные, но необратимые структурные изменения в молекуле ALP понижающие её каталитическую активность, либо эти конформационные изменения обусловлены стойким взаимодействием некоторых молекул ингибитора с молекулой фермента, которые не разрушаются даже после уменьшения концентрации левамизола путем добавления субстратной смеси. В любом случае, описанные выше методические особенности следует обязательно учитывать при проведении клинических и научных исследований. В противном случае, имеет место реальная опасность получения таких результатов эксперимента, которые обусловлены не объективными свойствами изучаемого объекта, а являются следствием особенностей исполнения применяемой методики.

Выводы

1. Левамизол не конкурирует с субстратом ALP за ее активный центр и не вызывает необратимого подавления активности фермента. Однако в случае первичного контакта молекул ALP с очень высокими дозами левамизола, и последующим уменьшением концентрации ингибитора путем разбавления, незначительная часть активности фермента оказывается утеряной.

2. ALP сыворотки крови собак с костной и печеночной патологией проявляют высокую чувствительность к ингибированию левамизолом. Абсолютная величина остаточной активности сывороточной ALP после ингибирования зависит как от концентрации левамизола, так и от исходной активности фермента. Процент остаточной активность сывороточной ALP после ингибирования зависит только от концентрации левамизола.

3. ALP активность сывороток собак с патологией печени более чувствительна к ингибированию левамизолом, чем ALP активность сывороток крови собак с нарушением метаболизма костной ткани. Однако это различие проявляется только при статистической обработке данных по большой выборке и не может быть использовано для дифференциации BALP и LALP активностей в отдельно взятом биологическом материале.

4. ALP активность сывороток собак со спонтанным или индуцированным гиперадренокортицизмом либо полностью не чувствительна к ингибированию левамизолом, либо данная чувствительность очень низкая, что зависит от соотношения активностей CALP и других изоферментов.

5. Тест на устойчивость ALP сыворотки крови к ингибирующему влиянию левамизола дает объективную информацию о длительном и перманентном повышении в организме собак гормонов коры надпочечников, поэтому может быть использован для диагностики гиперадренокортицизма как в экспериментальных, так и в клинических целях.

6. Тест следует проводить путем определения процента остаточной активность сывороточной ALP после ингибирования средними и высокими дозами левамизола.

7 В клинической биохимии, тест на гиперадренокортицизм следует считать положительным, если процент остаточной активность сывороточной ALP остается близким к 100% после ингибирования средними дозами левамизола ($4x10^{-5}$ моль/литр) или если остается более 20% активность сывороточной ALP при использовании высоких доз ингибитора ($33x10^{-5}$ моль/литр) при определении активности сывороточной ALP по методу Бессея-Лоури-Брока. Аналогичные дозы ингибитора могут быть использованы при определении

активность сывороточной ALP кинетическим методом.

8. При использовании теста с научной целью, для более точного определения количества CALP активности по отношению к общей активности сывороточной ALP следует использовать не менее 7-8 различных концентраций левамизола для построения графика зависимости активности фермента от дозы ингибитора и определения выхода графика на плато.

9. Клиническим и научным лабораториям следует адоптировать вышеописанную методику с учетом используемой аппаратуры и реактивов и отработать ее на контрольных биологических материалах.

Заключение

Как следует из материалов исследования, с помощью теста на устойчивость ALP сыворотки крови к ингибирующему влиянию левамизола можно легко и быстро (в отличии от таких методов как иммуноферментный или радиоизотопный анализ гормонов коры надпочечников) диагностировать гиперадренокортицизм у собак. При использовании кинетического метода определения активности сывороточной ALP, предварительные данные можно получить уже через 15-20 минут после взятия крови, что позволяет, к примеру, уже в процессе первичного приема выяснить является ли синдром полиурии-полидепсии следствием гиперадренокортицизма или нет. Однако данный метод в представленном выше исполнении не в состоянии указать на причину (их может быть несколько) перманентного повышения в организме животного гормонов коры надпочечников.

Классическая диагностика причин гиперадренокортицизма (болезнь Иценко-Кушинга, синдром Иценко-Кушинга, функциональный или лекарственный гиперадренокортицизм) и его следствий (синдром полиурии-полидепсии, ожирение, гепатомегалия, диабет, остеопороз) складывается из таких сложных и рутинных методов диагностики, как биохимический анализ крови, иммуноферментный или радиоизотопный анализ гормонов коры надпочечников и гипофиза, УЗИ надпочечников, рентгеновская или ЯМР томограмма головного мозга и т.д. Совершенно очевидно, что современная отечественная ветеринарная медицина не в состоянии предложить клиентам весь этот перечень необходимых диагностических услуг.

Однако, на сегодняшний день есть основание предполагать, что CALP изофермент ALP представляет собой не один, а несколько различных изоферментов, отличающихся по чувствительности к ингибирующему влиянию левамизола. Соотношение этих субизоферментов, по видимому, может быть различным как в зависимости от причины заболевания так и претерпевать изменение в процессе прогрессирования гиперадренокортицизма. Поэтому, дальнейшие исследования в этой области следует считать перспективными. Результатом работы может стать разработка простых и доступных для широкого применения методов диагностики этиологии заболевания и мониторинга за вовлечением в патологический процесс других органов и систем организма.

SUMMARY

In the given publication the data of research on influence levamisole on activity of an alkaline phosphatase of serum of dogs blood are submitted. The distinction of kind in levamisole suppression of activity of an alkaline phosphatase in serum of blood obtained from an animal with diseases of bone, hepatobiliary and endocrine systems are investigated. The capability of differentiated definition of activity bone, liver and Corticosteroid-induced isoenzymes in non-fractionated serum of dogs blood with the help of levamisole test is analysed. The methodical recommendations for application of the test with levamisole for diagnostics hyperadrenocorticism of dogs are given.

Литература

1. Асатиани В.С., Ферментные методы анализа, Москва. Наука. 1969.
2. Асквит П. Клиническое применение левамизола: Критический обзор. Последние достижения в клинической иммунологии. Под редакцией Томпсон Р.А. Москва. Медицина. 1983 г. Стр. 465-^92.
3. Бокарев А.В., Стекольников А.А. Активность щелочной фосфатазы и концентрация сиаловых (нейраминовых) кислот в сыворотке крови у собак с некоторыми патологиями костной системы. Актуальные проблемы ветеринарной медицины: сборник научных трудов № 134 СПбГАВМ. 2002 г. Стр. 31-33.
4. Бокарев А.В., Стекольников А.А., Суворов О.Н. Виды ингибирующего влияния левамизола на ALP, в зависимости от изоферментного состава ее сывороточного пула. Структурно-функциональные особенности биосистем севера (особи, популяции, сообщества). Материалы конференции (26-30 сентября 2005 года, г. Петрозаводск). Часть 1 (А-Л). Петрозаводск. Издательство ПетрГУ 2005 г. Стр. 50-52.

. Гусель В.А.,Маркова И.В. Справочникпедиатора по клинической фармакологии. Ленинград. Медицина. 1989 год.

. Герке А.Н., Герке В.С., Миролюбива СЮ. Синдром кушинга у щенков породы Лабродор ретривер. Материалы 14 конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины» 14—15 июня.

2001 год. Стр. 59.
7 Елен Миллер. Обоснованное и ошибочное использование глюкокортикоидов в ветеринарной: практике. Woltham Focus. Том 9. №4.1999 год. Стр. 26-31.
8. Ивантср Э.В. Основы практической биометрии. Издательство «Карелия». Петрозаводск. 1979 год.
9. Лспахин В.К., Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С. Клиническая фармакология с международной номенклатурой лекарств. Москва. Издательство Университета дружбы народов. 1988 год.
10. Лойда 3., Госсрау Р. Шиблер Т. Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. Москва, «Мир». 1982 г.
11 Майкл Д. Уиллард, Дэвид К. Тведт. Нарушение функции желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы и печени. Лабораторная диагностика в клинике мелких домашних животных. Москва. «Аквариум». 2004 г. стр. 194-235.
12. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Том. 2. Издательство «Картя Молдовеняска» 1989 год.
13. Меньшиков В.В. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. Москва. Медицина. 1987.
14. Млыхина Л.С Влияние некоторых гормонов и биологически активных веществ на уровеннь cAMP **Б** лимфоцитах больных хроническим лимфолейкозом на фоне лечения левамизолом. Циклические нуклеотиды. Тезисы докладов 3 Всесоюзного симпозиума. [Каисв. Май 1980 г.] Киев. «Наукова думка». 1980 год. Стр. 78-79.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Издательство «Медиа Сфера». Москва. 2003 год.
16. Стекольников А.А.. Бокарев А.В. Прогностическое значение печеночного изофермента ALP при лечении собак циклофосфаном. Структурно-функциональные особенности биосистем севера (особи,популяции, сообщества). Материалы конференции (26-30 сентября 2005 года, г. Петрозаводск). Часть 2 [М-Я]. Петрозаводск. Издательство ПстрГУ 2005 г. Стр. 152-154.
17 Элиот Д., Досон Р., Элиот У, Джонс К. Справочник биохимика. Москва. «Мир». 1991.
18. Delmas Pierre D. Biochemical markers in valuation of metabolism of bone tissue. Clinical Chemistry, 1985.Vol 30. pp. 247-262.
19. Ehrhart N, Dernell WS. Hoffmann WE, Weigel RM, Powers BE, Withrow SJ. Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma: 75 cases (1990-1996). J Am Vet Med Assoc. 1998 Oct 1;213[7]:1002-6.
20. G Frenette, JY Dube, and RR Tremblay. Origin of alkaline phosphatase of canine seminal plasma. Arch Androl, January 1,1986; 16[3]: 235-41.
21. Garzotto CK, Berg J, Hoffmann WE, Rand WM. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. J Vet Intern Med. 2000 Nov-Dec; 14[6]: 587-92.
22. J. Leland Raymond, Heather L. Tarpley, Kenneth S. Latimer, Perry J. Bain. Alkaline Phosphatase Activity as a Clinical Chemistry Diagnostic Aid. Department of Pathology (Tarpley, Latimer), College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, 2004. GA 30602-7388.
23. Karayannopoulou M., Koutinas A.E, Polizopoulou Z.S., Roubies N., Fytianou A., Saridomichelakis M.N., Kaldrymidou E. Total Serum Alkaline Phosphatase Activity in Dogs with Mammary Neoplasms: a Prospective Study on 79 Natural Cases. Journal of Veterinary Medicin, Series A. Desember 2003, vol. 50, no. 10,'Pp. 501-505 [5].
24. Koshida K, Nishino A, Yamamoto H, Uchibayashi T, Nailo K, Hisazumi H, Hirano K, Hayashi Y, Wahren B, and Andersson L.The role of alkaline phosphatase isoenzymes as tumor markers for testicular germ cell tumors. J Urol, July 1,1991; 1.46[1 j: pp. 57-60.
25. Marilyn A. Luduena, Howard H. Sussman. Characterization of KB Cell Alkaline Phosphatase. Evidence of similarity to placental alkaline phosphatase. The journal of biological chemistrv. 1976.Voi. 251, No. 9, Issue of May 10, pp. 2620-2628',
26. Sanecki R. K., Hoffmann W E., Gelberg H. B.and Dorner J. L. Subcellular location of corticosteroid-induced alkaline phosphatase in canine hepatocytes. Veterinary Pathology, Vol 24, Issue 4 pp. 296-301.
27. Smith GE, Harris H., and Peters TJ. Studies of the biochemical and immunological properties of human neutrophil alkaline phosphatase with comparison to the established alkaline phosphatase isoenzymes. Clin Chim Acta, September 29,1984; 142(2]: 221-30.
28. Teske E, Rothuizen J, de Bruijne JJ, Mol JA. J Chromatogr. Separation and heat stability of the corticosteroid-induced and hepatic alkaline phosphatase isoenzymes in canine plasma.1986 Nov 21;369[2]:349-56.

А.В. **Чвала, И.А. Пахмутов, Н.Г. Семенова, Л.Ф. Филиппова**
(Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, г. Нижний Новгород, Россия)

СИСТЕМНАЯ ЭНЗИМОТЕРАПИЯ СОБАК ПРИ ЭНДОМЕТРИОЗАХ

Проблема эндометриозов в настоящее время приобрела особую актуальность в связи с возрастанием частоты этого заболевания, при котором нарушается воспроизводительная функция и сокращается продолжительность жизни. [1]

Эндометриоз рассматривается как гормонально-зависимое заболеваниие. развивающееся на фоне нарушения иммунного гомеостаза. Сущность заболевания заключается в кистознои гиперплазии с последующим бактериальным заражением или без него [3]. Патогенетически развитие гиперплазии эндометрия и перерождение его поверхности в виде многочисленных кист, образованных из измененных желез, можно разделить на два этапа. На первом этапе наблюдается гиперэстрогенемия и связанные с этим изменения в тканях эндометрия (чрезмерная ггроли-